**改訂 2015 年 9 月 30 日（第 7 版）
体外診断用医薬品　　*改訂 2015 年 1 月 21 日（第 6 版）
承認番号22200AMX00914000　　日本標準商品分類番号87749

ご使用に際しては本添付文書をよく読んでからご使用ください。

マイコバクテリウム核酸キット

ジーンキューブ® MTB

［全般的な注意］

ア. 本品は全自動遺伝子解析装置GENECUBE®の専用試薬です。
イ. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
ウ. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて医師が総合的に判断してください。
エ. 添付文書以外の使用目的及び使用方法でご使用されて得られた測定結果については保証を致しかねます。
オ. 本品を使用する前には必ず安全データシート（SDS）を確認してください。またSDS は末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。*
カ. 使用する専用機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

［形状・構造等（キットの構成）］

1. 酵素試薬［ KOD Mix ］
   KOD DNA ポリメラーゼ
   dNTP※
2. プライマー・プローブ試薬［ MTB Mix ］
   MTB プライマー F
   MTB プライマー R
   MTB QProbe
   硫酸マグネシウム
3. 内部コントロール試薬［ IC Mix ］
4. 陽性コントロール溶液［ MTB PC ］
5. 陰性コントロール溶液［ MTB NC ］

※「dNTP」はデオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合物です。

［使用目的］**

喀痰又は喀痰培養液中の結核菌群 DNA の検出（結核診断の補助）

［測定原理］**

本試薬は、「Polymerase Chain Reaction (PCR)法による標的核酸増幅」と「蛍光標識プローブ（QProbe）※を用いた標的核酸検出」を利用した結核菌群 DNA 検出試薬です。

結核菌群の DnaJ 遺伝子領域[1]をターゲットに特異的なプライマーF とプライマーRをアニーリングさせます。KOD DNA ポリメラーゼによって各プライマーの伸長が起こります。この時 dNTP を基質、マグネシウムイオンを酵素の活性触媒として用います。プライマーのアニーリング、伸長を繰り返し行うことで標的核酸を増幅させます。その後、増幅核酸と結核菌群に特異的な配列を持つ MTB QProbeをハイブリダイゼーションさせて蛍光の変化を解析することで結核菌群の DNA 検出を行います。

増幅に「高速増幅可能な KOD DNA ポリメラーゼ」[2]、検出に「シンプルな設計のQProbe」[3)、4)]を利用して簡便迅速な検出を可能にします。また、容器を開封せずに増幅検出を行うホモジニアス系のためキャリーオーバーコンタミネーションを防止し、偽陽性の発生を抑えることができます。さらに、内部コントロールを増幅・検出反応系に組み込むことで臨床検体由来の妨害物質による PCR 阻害を知ることができ、結核菌群の DNA 検出における偽陰性を防ぐことができます。

※「QProbe」は日鉄住金環境株式会社が特許実施権を有する消光プローブです。*

［操作上の注意］

1. 検体について**
   （1）本品の試料には、検体（喀痰又は喀痰培養液）から抽出した DNA 溶液（検体調製液）又は希釈した喀痰培養液を用います。
   （2）血液成分が多量に含まれている検体は避けてください。血液成分が多量に含まれている検体又はヘパリンを多く含む検体を用いる場合は、試料調製の段階で十分に血液成分又はヘパリンを取り除いてください。検体調製液中に血液成分やヘパリンが残存していると増幅検出反応が阻害されて陰性と判定されることがあります。
   （3）喀痰培養液を用いる場合は、菌が発育した時点の培養液を用いてください。
   （4）咽頭粘液や唾液あるいは鼻水ではなく膿性部分が存在する良質な喀痰を採取するようにしてください。
   （5）検体を保存する場合は、−80℃以下で保存してください。冷凍保存された検体を使用するときは、必ず室温に戻してから使用してください。

2. 試料の調製方法**
   （1）検体（喀痰）の調製方法
   タンパク質分解酵素であるセミアルカリプロテアーゼ（SAP）※1で検体均質化処理を行った後、NALC−NaOH 法で処理して消化及び汚染除去を行ってください。NALC−NaOH 法は、一般的に抗酸菌検査である塗抹検査や培養検査の検体前処理法としても用いられています[5)]。他の方法で前処理された試料では本試薬の性能を得られないことがありますのでご注意ください。
   ①臨床検体を等量〜5 倍量の SAP で均質化します。
   ②底が円錐形の滅菌プロピレンスクリューキャップ付 50mL遠心管に 1mL〜15 mLの均質化検体を移し、倍量の NALC−NaOH 溶液※2を加えます。
   ③キャップを固く締め、ボルテックスミキサーで撹拌（20 秒以内）後、容器を転倒してスクリューキャップチューブの内面を NALC−NaOH 溶液に曝します。
   ④20〜25℃で 15 分間静置し、その間時々軽く手振りします。
   ⑤50mL目盛りのところまで冷滅菌リン酸緩衝液（pH6.8）を加え、キャップを固く締めます。
   ⑥エアロゾルフリーの封じ込め遠心カップ付冷却遠心機で 3000×g、4℃、20 分間遠心します。
   ⑦消毒剤を入れた容器に上清を静かに捨て、遠心管の口をアルコール綿で拭きます。
   ⑧残渣を 1mLの滅菌蒸留水に浮遊させます（前処理済み検体）。
   ⑨前処理済み検体を核酸抽出処理に使用します。すぐに使用しない場合は−20℃以下で保存します。
   ※1 スプタザイム（極東製薬）、プレソルブ（ニッスイ）の製品名で市販されています。各製品の添付文書に従って操作してください。
   ※2 NALC−NaOH 溶液の組成を示します。

4%水酸化ナトリウム	50mL
0.1mol/L（2.9%）クエン酸ナトリウム	50mL

   両者を混和、121℃、15 分間高圧滅菌して保存します。その後、使用する前に NALC 粉末 0.5g を加えて 24 時間以内に使用します。
   （2）検体（喀痰培養液）の調製方法
   検体（喀痰培養液）を 80℃で 10 分間加熱後、精製水で 100 倍に希釈します。希釈した喀痰培養液を核酸抽出に使用します。また、希釈した喀痰培養液は核酸抽出を行わずにそのまま検体調製液として測定に使用することもできます。すぐに使用しない場合は−20℃以下で保存します。
   （3）核酸抽出方法
   核酸抽出にあたってGENECUBE®を用いる場合は、GENECUBE®及びジーンキューブ®専用前処理セットの取扱説明書をご参照ください。
   また、他の核酸抽出キットを用いる場合、注意事項など詳細については製品の説明書に従って操作してください。

3. 交差反応**
   結核菌群 4 種（*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*）から抽出したDNA試料について測定を行ったところ、検出が確認されました。非結核性抗酸菌 38 種から抽出した DNA 試料について測定を行ったところ、交差反応は認められませんでした。

4. 共存物質の影響
   ヒトゲノム混入における影響については、10万コピー／テストのヒトゲノムが混入しても本試薬の測定に影響しないことを確認しました。

5. コンタミネーションの防止**
   本品は、試薬の分注から増幅専用容器であるプラスチックキャピラリーへの試薬の充填、増幅検出までをGENECUBE®にて自動で行います。増幅検出を一つの容器で開封することなしに行え、かつ測定を終了した試薬はそのまま自動で廃棄するため、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を抑えることができます。しかし、GENECUBE®では検体の調製段階で発生するクロスコンタミネーションは防止することができませんので、注意する必要があります。特に検体の前処理中に発生することが考えられますので、以下の操作法を遵守するようにしてください。
   （1）作業区域の分割
   検体の調製は必ず安全キャビネット内で行ってください。
   （2）手袋、マスク、白衣の着用
   人体に付着した微生物や体液（例えば唾液、汗）の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも手袋、マスク、白衣を着用して操作を行ってください。GENECUBE®への試薬のセット時には、検体の調製時に使用した手袋は使用せず、新しい手袋を使用してください。
   （3）検体の付着の防止
   遠心チューブや検体保存容器の蓋に付着した検体は、蓋を開けるときに手袋へ付着する可能性が高いため、軽く遠心を行うなどして検体が蓋に付着していない状態で開閉してください。複数の検体を同時に取扱う時は、各容器の蓋を開放したまま次の操作を行わず、必ず蓋を閉めてから次の操作へ移ってください。
   （4）フィルター付ピペットチップの使用
   検体の調製時に使用するピペットがエアーディスプレースピペットの場合、サンプルとピストンの間に空気が介在するため、ピペット内部を汚染してしまう可能性があります。ピペット内部の汚染を防止するため、フィルター付のチップを使用してください。

以上の操作法を遵守してもコンタミネーションが起こる可能性がありますので、結果の判定につきましては臨床症状や培養など他の検査結果も含めて総合的に判断してください。

6. その他留意事項**
   （1）検体調製液中に PCR の妨害物質であるヘパリンや EDTA が含まれていると正常な測定ができませんのでご注意ください。
   （2）検体中に標的となる DNA が存在しても検体前処理操作で最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。
   （3）本品の酵素試薬［ KOD Mix ］、内部コントロール試薬［ IC Mix ］はジーンキューブ®MAC との間で共通試薬として使用できます。
   （4）喀痰培養液を試料とするとき、希釈倍率が 1000 倍より大きい場合、培養液に含まれる菌量が最少検出感度を下回り、陽性検体が陰性と判定されることがあります。また、希釈倍率が 10 倍より小さい場合、培養液に含まれる物質によって増幅検出反応が阻害されることがあります。

［用法・用量（操作方法）］

1. 試薬・試液調製法
   ・酵素試薬［ KOD Mix ］：そのまま用います。
   ・プライマー・プローブ試薬［ MTB Mix ］：そのまま用います。
   ・内部コントロール試薬［ IC Mix ］：そのまま用います。
   ・陽性コントロール溶液［ MTB PC ］：そのまま陽性コントロールとして用います。
   ・陰性コントロール溶液［ MTB NC ］：そのまま陰性コントロールとして用います。

2. 必要な器具、器材など**
   ・GENECUBE® 及びその付属品、取扱説明書
   ・マイクロピペット及びチップ（検体調製液分注用）
   ・ゴム手袋、マスク、白衣
   ＜消耗品＞
   ・ジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリー
   ・ジーンキューブ®専用 分注チップ
   ・8 連チューブ（試薬分注用）株式会社イナ・オプティカ T−028
   ・サンプルチューブ（0.5mL）（検体調製液、陽性コントロール溶液、陰性コントロール溶液分注用）ザルスタット株式会社 72.699S

3. 操作方法**
   本品は、GENECUBE®を用いて測定してください。
   機器の所定の位置に試薬等をセットした後、機器の取扱説明書に従って測定を開始します。（3）〜（8）は自動で行われます。
   （1）酵素試薬［ KOD Mix ］、プライマー・プローブ試薬［ MTB Mix ］、各消耗品を機器の所定の位置にセットします。
   （2）陽性コントロール溶液［ MTB PC ］、陰性コントロール溶液［ MTB NC ］及び検体調製液をそれぞれ分注した 0.5mL チューブを機器の所定の位置にセットします。
   （3）検体調製液 3 容量、内部コントロール試薬［ IC Mix ］1 容量、酵素試薬［ KOD Mix ］3 容量、プライマー・プローブ試薬［ MTB Mix ］3 容量を混合し、反応液を調製します。
   （4）反応液をジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリーに充填します。
   （5）GENECUBE®の増幅反応パラメーター※1で、増幅反応を行います。
   （6）GENECUBE®の検出反応パラメーター※2で、検出反応を行います。その後、測定波長 510nm〜550nm 及び 573nm〜613nm での蛍光値を測定します。
   （7）陽性コントロール溶液［ MTB PC ］及び陰性コントロール溶液［ MTB NC ］について検体調製液と同様に(3)〜(6)の操作を行います。
   （8）測定した蛍光値は専用の解析ソフトにより、蛍光変化量を表す蛍光微分値に変換されます。蛍光微分値を用いて結果の解析が行われ、測定画面上に判定結果が表示されます。

※1 増幅反応パラメーター**

	35.0	℃	0.0	sec
	94.0	℃	30.0	sec
①変性	97.0	℃	1.0	sec
②アニーリング	58.0	℃	3.0	sec
③伸長	63.0	℃	5.0	sec
	35.0	℃	0.0	sec
①〜③サイクル回数		50.0		

※2 検出反応パラメーター

94.0	℃	30.0	sec
39.0	℃	30.0	sec
40.0〜75.0	℃	0.09	℃/sec

［測定結果の判定法］

1. 判定方法**
   GENECUBE®は検体、陽性コントロール及び陰性コントロールの測定結果を自動的に判定します。検体の判定結果は、陽性「＋」、陰性「−」、判定無効「Invalid」で表示されます。
   （1）判定無効の場合
   「Invalid」と表示された場合、その測定は無効となります。検体の調製から行い、再度測定を実施してください。
   （2）以下の場合は、その測定は無効になります。全ての試薬を入れかえて、再度測定を実施してください。
   ・陽性コントロール溶液［ MTB PC ］の測定結果が、陰性を示した場合
   ・陰性コントロール溶液［ MTB NC ］の測定結果が、陽性を示した場合

2. 判定上の注意
   （1）以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。
   a）唾液成分が多い、血液が混入している、室温で長時間放置した、など良質な喀痰ではない検体を使用した場合
   b）塗抹検査陰性もしくは 100 μL 中 100 個以下の菌体数しかない検体を使用した場合
   c）検体調製が不十分で、菌体のロスまたは DNA の分解が生じている検体を使用した場合
   d）ヘパリンを多く含む検体を使用した場合
   e）保存方法が適切に行われていないもしくは有効期限が過ぎている試薬を使用した場合
   f）保存が適切に行われていない検体を使用した場合**
   （2）臨床検体中に含まれる結核菌が死菌である場合、放出された結核菌 DNA を検出する可能性があります。
   （3）本品で陰性と判定されても必ずしも結核菌の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく診断は、他の検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。

[性能]

1. 性能

用法・用量(操作方法)欄の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行なった場合、下記の規格に適合します。

(1)感度試験

①陰性コントロールを所定の操作で測定するとき、陰性を示します。

②陽性コントロールを所定の操作で測定するとき、陽性を示します。

(2)正確性試験

①自家管理陰性試料1～3を測定するとき、陰性を示します。

②自家管理陽性試料1～3を測定するとき、陽性を示します。

(3)同時再現性試験

①自家管理陰性試料1を4回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。

②自家管理陽性試料1を4回同時に測定するとき、すべて陽性を示します。

(4)最小検出感度

10コピー／テスト(GENECUBE®測定)

(5)較正用基準物質

本品の較正用基準物質には結核菌群 DnaJ 遺伝子配列の一部を含む DNA 溶液を使用しています。

2. 相関性**

本品とPCR法を原理とする既承認品及び培養同定法の相関性を検討しました。

臨床検体(喀痰)122 例を試料に測定を行ったところ、表 1 及び表 2 に示すように一致率は 99.2%で良好な相関を示しました。

また、臨床検体(喀痰培養液)160 例を試料に測定を行ったところ、表3及び表4に示すように一致率は 100.0%で良好な相関を示しました。

表1 既承認品との相関性試験成績(喀痰)

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	60	0
	陰性	1※1	61

※1 培養同定検査の結果、陰性と判定されました。

検討例　122 例

全体一致率　99.2%　(121/122)

表2 培養同定検査法との相関性試験成績(喀痰)

		培養同定法	
		陽性	陰性
本品	陽性	59	1※2
	陰性	0	62

※2 塗抹検査の結果、陰性と判定されました。

検討例数　122 例

全体一致率　99.2%　(121/122)

表3 既承認品との相関性試験成績(喀痰培養液)**

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	80	0
	陰性	0	80

検討例　160 例

全体一致率　100.0%　(160/160)

表4 培養同定検査法との相関性試験成績(喀痰培養液)**

		培養同定法	
		陽性	陰性
本品	陽性	80	0
	陰性	0	80

検討例数　160 例

全体一致率　100.0%　(160/160)

[使用上又は取扱い上の注意]

1. 取扱い上の注意**

(1)検体を取扱う時は、マスク(N95 マスク推奨)、使い捨て手袋、白衣などの保護具を着用して、検体を吸い込んだり体に付着したりすることがないようご注意ください。また、感染を避けるため口によるピペッティングは行わないでください。

(2)検体は感染性を有するものとして、各施設の安全管理規程に従って取扱ってください。

(3)試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。

(4)試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。

(5)試薬が飛散した場合は、拭き取ってください。

(6)検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 0.5%)などの消毒液を使用してしっかりと拭き取ってください。

(7)検体を取扱う際に使用した器具類は、使い捨てのものであれば適切な処理の後廃棄、繰り返し使用するものであれば高圧蒸気滅菌器を用いて121℃、20分間以上滅菌処理を行うか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度0.5%)などに1時間以上浸すなどして十分に消毒してからご使用ください。

2. 使用上の注意**

(1)機器、試薬および消耗品は専用のものを使用し、それらは他の目的に転用しないでください。

(2)本品に含まれる試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結させたり、長時間室温に放置したりしないでください。また、貯蔵方法以外の条件で保存した試薬や使用期限が過ぎている試薬は使用しないでください。

(3)すべての構成試薬は継ぎ足して使用しないでください。

(4)本品で用いているプライマーやプローブは細菌遺伝子のうち保存性が高い遺伝子領域をターゲットとしていますが、稀に発生する遺伝子変異等により反応性が低下し、正確に測定できない場合があります。

3. 廃棄上の注意**

(1)使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。

(2)試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。

(3)使用済みの試薬及び消耗品を廃棄する場合には、溶液を飛散させないように廃棄してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯蔵方法　2～8℃で保存

有効期間　1年(期限は外箱に表示)

[包装単位]**

商品名	構成試薬名、包装内容
ジーンキューブ® MTB	酵素試薬[KOD Mix] 140μL×6本
	プライマー・プローブ試薬[MTB Mix] 140μL×6本
	内部コントロール試薬[IC Mix] 300μL×1本
	陽性コントロール溶液[MTB PC] 300μL×1本
	陰性コントロール溶液[MTB NC] 300μL×1本

[主要文献]**

1) Yamada-Noda M. *et al.* *Mycobacterium* species identification - A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst Appl Microbiol. 2007 Sep; 30(6): 453-462.

2) Kitabayashi M. *et al.* Gene Cloning and Polymerase Chain Reaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Oct; 66(10): 2194-2200.

3) Kurata S. *et al.* Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15; 29(6): e34.

4) Torimura M. *et al.* Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Anal Sci. 2001 Jan; 17(1): 155-160.

5) 樋口 武史ほか 結核菌検査指針2007 財団法人結核予防会 2007: 31-36

文献請求先　末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。

TOYOBO
Ideas & Chemistry

[問い合わせ先]

東洋紡株式会社 診断システム事業部

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

協和メデックス株式会社 学術担当

〒104-6004 東京都中央区晴海一丁目8番10号

ダイヤルイン 03-6219-7608

[製造販売元]

東洋紡株式会社

福井県敦賀市東洋町10番24号